

# 조직 재생을 위한 Poly (D, L-lactide-co-glycolide) 표면에 (1→3)(1→6)-β - glucan 고정에 대한 세포 점착 및 성장 효과

이상길<sup>1</sup>, 이정복<sup>1,2</sup>, 유성미<sup>1,2</sup>, 박종철<sup>3</sup>, 최재봉<sup>4</sup>, 김정구<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>인제대학교 의용공학과

<sup>2</sup>인제대학교 BK21 바이오장기 조직재생 사업팀

<sup>3</sup>연세의과대학 의학공학교실

<sup>4</sup>한성대학교 기계시스템공학과

(Received July 31, 2006. September 19, 2006)

## Surface Immobilization of β - (1→3)(1→6)-glucan onto Biodegradable Polymer for Tissue Regeneration

S. G. Lee<sup>1</sup>, J. B. Lee<sup>1,2</sup>, S. M. Yu<sup>1,2</sup>, J. C. Park<sup>3</sup>, J. B. Choi<sup>4</sup>, J. K. Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biomedical Engineering, Inje Univ.

<sup>2</sup>BK21 Bio-organ Tissue Regeneration Project Team, Inje Univ.

<sup>3</sup>Dept. Medical Eng., Collage of Med., Yonsei Univ.

<sup>4</sup>Dept. Mechanical Systems Eng., Hansung Univ.

### Abstract

We examined the effects of β-glucan-reinforced PLGA film and scaffold on HDFs (human dermal fibroblast) attachment and proliferation. The PLGA films were prepared by simple solvent-casting method. The prepared films were grafted with (1→3)(1→6)-β-glucan in various ratios after plasma treatment on surface.

The surface of the film was characterized by contact angle measurement, scanning electron microscope (SEM), and Fourier-transform infrared spectrophotometer (FT-IR). The amount of (1→3)(1→6)-β-glucan in the prepared film was indirectly determined by phenol-sulfuric acid method. The HDFs (Human dermal fibroblasts) were used to evaluate the cell attachment and proliferation on PLGA specimens before and after plasma/β-glucan treatment.

The result showed that the plasma treated groups exhibited more amount of β-glucan might be grafted than the non plasma treated groups. Cell attachment was significantly enhanced in the plasma/β-glucan grafted group after 4 hours incubation (p<0.05) due to the improved hydrophilicity and cytoactivity effect of the β-glucan. The cell proliferation of plasma/β-glucan (2mg/ml) grafted group was the highest rate among the groups (p<0.05).

Key words : tissue regeneration, PLGA, β - glucan, plasma treatment, cell affinity

### 1. 서 론

피부 상처 조직의 회복 과정은 여러 조직 및 세포의 상호작용을 요구하는 복잡한 생리학적 과정이다. 특히 당뇨병, 욕창, 정맥성 궤양 및 과다한 조직의 파손 및 혈관구조가 손상되는 만성/

심재성 조직 손상의 경우 상처 수복 능력이 현저히 결핍되어 있다. 이런 과다한 조직의 기능 및 손실로 인한 치료로 조직의 재생을 촉진시킬 수 있는 생체 조직공학을 이용한 고분자 재료에 대한 연구가 많이 진행되고 있다[1].

조직 재생용 고분자 재료로서 필요한 점은 적절한 다공성 구조와 고분자 표면에 세포 점착 및 증식이 필요하다. 특히 재료의 표면의 화학적 구성은 생체 적합성, 기계적 물성치 및 세포의 점착 및 증식에 매우 중요한 요소로 작용한다[1,2]. 즉 조직공학적 측면에서 고분자 재료의 표면 소수성으로 인해 세포의 점착 및 증식이 이

본 연구는 과학기술부 특장기초연구 (과제번호:R01-2004-000-10580-0) 지원에 의해 연구되었음.

Corresponding Author : 김정구

경남 김해시 여방동 607번지, 인제대학교 의용공학과, 의료용 고분자실험실

Tel : 055-320-3664 / Fax : 055-327-3292

E-mail : jkkim@bse.inje.ac.kr

루어 지지 않음으로 인한 단점을 해결하기 위해 재료의 표면을 친수성으로 개질을 하는 연구가 진행되고 있으며, 또한 재료의 표면에 점착 단백질(fibronectin, vitronectin or collagen) 또는 세포 점착 펩타이드(tripeptide RGD)를 표면에 고정시켜 세포 적합성을 증가시키는 연구결과들이 보고되었다[3,4,5].

생체 적합성 고분자 재료인 PLGA는 천연고분자(collagen, gelatin)에 비해 단량체의 조성을 조절하여 생분해 속도 및 기계적 강도를 조절할 수 있으며 가공이 용이하다는 장점이 있어 조직공학에서 많이 사용되고 있다[6,7].

(1→3)(1→6)-β-glucan은 포도당 분자간에 β-1,3-결합으로 이루어진 주사슬에 β-1,6결합으로 가지를 이루는 고분자 다당류 물질로서 버섯 균사체나 효모 세포벽으로부터 추출하거나, *Aureobasidium* 속(흑효모 일종)의 미생물 발효에 의해 생산되며, 아가리쿠스, 영지, 운지버섯 등 여러 항암버섯의 주요 약리작용을 갖는 무색, 무취의 수용성 다당류이다[8,9,10]. 또한 β-glucan은 항바이러스, 항박테리아 및 항응고 효과를 가지며 상처 치유에 효과적이다[10,11,12]. 최근에는 면역세포 보다는 인간섬유모세포(HDFs, human dermal fibroblast)에 β-glucan binding site에 관한 연구가 진행되었다[13,14]. 이 연구들은 β-glucan의 면역 자극 활성 효과를 두 가지 측면에서 상처치유에 연관시켰다. 첫째로는 대식세포의 기능을 강화시켜 다양한 사이토카인을 분비 가능하게 함으로써 간접적으로 상처 조직의 치유를 활성화 시키는 면과 두 번째로는 섬유모세포의 직접적인 영향을 주어 조직의 활성화를 도모를 한 것이다.

본 실험은 생분해성 고분자 표면에 친수성을 주기 위한 플라즈마 처리와 섬유모세포 활성을 높이기 위한 방법으로 β-glucan coating을 하여 세포 점착 및 증식에 관한 연구를 하였다.

## II. 재료 및 방법

### A. PLGA 필름 제작

PLGA(Poly(D,L-lactide-co-glycolide)50:50(Alkermese, USA, M<sub>w</sub> =71000)을 클로로포름을 사용하여 solvent-casting 방법을 이용하여 지름 12mm인 필름을 제작하였다.

### B. PLGA시편의 표면 개질

마이크로파를 이용한 헬륨 플라즈마 시스템(13.56KHz, 30w, atmospheric pressure)을 이용하여 필름과 지지체에 10초간 플라즈마 처리를 하였다.

단순담금법을 이용하여 PLGA 시편을 70% 에탄올에 5분간 멸균 시킨 다음 (1→3)(1→6)-β-glucan(WAKO, Osaka, Japan)을 PBS에 농도별로 용해시킨 용액에 30℃에서 필름은 3시간, 지지체는 10min을 담가 표면처리를 한 후 12시간 냉동 건조 하였다. 실험에 사용된 시편은 Table 1과 같다.

### C. PLGA시편의 물리·화학적 특성 분석

표면 개질된 PLGA 필름의 표면 특성 분석을 위하여 FT-IR (Fourier-transform infrared spectroscopy, BRUKER IFS-88)를 사용하여 표면의 화학적 분석을 하였으며 DCA(Direct contact angle analyzer, Phnix 150)을 이용하여 접촉각을 측정하여, 필름 표면의 친수화를 분석하였다.

표 1. 표면 개질 방법에 따른 그룹

Table 1. Types of the prepared specimen groups

시편	처리	Plasma treatment	2mg/ml β-glucan coating	5mg/ml β-glucan coating
N2	No	No	Yes	No
N5	No	No	No	Yes
Nf	No	No	No	No
P2	Yes	Yes	Yes	No
P5	Yes	Yes	No	Yes
Pf	Yes	Yes	No	No

탄수화물 측정 방법 중 페놀-황산법을 이용하여 표면 개질된 PLGA 필름 표면의 β-glucan의 정량 분석하였다.

SEM(Scanning electron microscopy, Hitachi S-4300DSE.)를 이용하여 필름의 표면 개질 후의 표면을 관찰하였다.

### D. 세포 증식에 대한 β-glucan의 영향

세포 증식에 적합한 β-glucan의 농도를 알아보기 위하여 β-glucan을 세포 배양 배지에 농도별로 녹여 인간 섬유모세포(HDFs, human dermal fibroblast)를 1×10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup> 농도로 24well culutre plate에 seeding하여 β-glucan을 농도별로 녹인 culture media (Dulbecco's Modified Eagles Medium, DMEM)를 사용하여 배양하였다. seeding 후 6일째에 MTT assay를 이용하여 β-glucan이 세포 증식에 미치는 영향을 확인하였다. 세포 증식에 적합한 β-glucan농도를 확인하여 PLGA 시편의 표면개질에 이용하였다.

### E. 표면 개질된 PLGA 시편의 세포적합성 분석

표면 개질된 PLGA 필름의 세포 초기 점착도를 측정하기 24well plate에 필름을 고정한 후 HDFs를 1×10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup>로 seeding한 후, 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 세포배양기 내에서 4시간 후에 MTT assay를 이용하여 초기 점착된 세포의 viability를 측정하였다.

표면 개질된 PLGA 시편의 세포 증식도를 보기 위하여 필름은 24well plate에 고정하여 HDFs를 2×10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup>로 seeding하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 세포배양기 내에서 1, 3, 6일동안 CCK-8(WST-8, Dongindo Lab., Kumamoto, Japan)을 이용하여 cell viability를 측정하여 PLGA 필름의 세포의 증식을 관찰하였다.

**F. Morphology 분석**

6일간 세포가 배양된 각각의 필름을 HBSS로 씻은 후 3% formaldehyde 수용액으로 고정 시켰다. 세포를 고정 시킨 필름을 H&E (Hematoxylin and Eosin) staining 한 다음 염색 정도를 광학 현미경으로 관찰하였다.

SEM 분석을 위하여 세포가 배양된 필름을 3% formaldehyde 수용액으로 고정 시킨 다음 50, 60, 70, 80, 90, 100vol%의 에틸알코올을 순차적으로 이용하여 시편을 탈수시킨 후 SEM 촬영을 하였다.

**G. 통계분석**

모든 통계분석은 SPSS를 이용하여 일원배치 분산분석(one way ANOVA)을 실시하였다.

**III. 결과 및 고찰**

**A. PLGA 필름의 물리·화학적 분석**

Fig 1은 β-glucan을 단순 담금에 의해 표면 개질된 PLGA 필름의 표면 특성을 분석하기 위하여 FT-IR 스펙트럼으로 나타내었다. 분석 결과, 단순 담금으로 β-glucan을 그래프트한 시편에서 β-glucan의 특정 peak (1614~1630cm<sup>-1</sup>)가 관찰됨으로서 단순 담금으로도 β-glucan이 coating됨을 확인하였다.

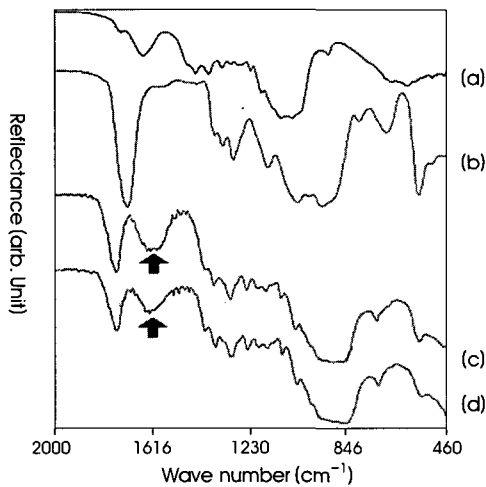


그림 1. FT-IR 스펙트럼 (a) β-glucan; (b) PLGA; (c) 50mg/ml β-glucan을 코팅한 PLGA 필름; (d) 75mg/ml β-glucan을 코팅한 PLGA 필름. 표시된 화살표는 β-glucan의 특정 피크를 가르킴.

Fig. 1. FT-IR spectrum of (a) β-glucan; (b) PLGA; (c) 50mg/ml β-glucan coated PLGA film; (d) 75mg/ml β-glucan coated PLGA film. Arrowheads indicate the specific peak of β-glucan.

플라즈마/β-glucan을 표면 처리한 PLGA 필름의 친수화 측정을 위하여 접촉각을 측정된 결과를 Table 2에 나타내었다. 플라즈

마를 처리한 시편(Pf)에서 대조군에 비해 접촉각이 감소하였다. 또한 β-glucan을 처리한 실험군(N2,N5)에서 접촉각이 감소하여 친수화가 증가된 것을 확인하였다. 이것은 Lee등이 연구한 β-glucan을 coating한 Petri dish가 높은 친수성을 가진 것과 연관된다[1]. 하지만 Fig 2의 SEM을 이용한 표면 개질에 따른 PLGA 필름의 표면 관찰에서 플라즈마 처리 후 β-glucan을 coating한 실험군(Fig 2(d))은 표면의 거침으로 인해 접촉각을 측정할 수 없었다.

표 2. 표면 개질된 PLGA 필름의 접촉각 비교  
Table 2. Contact angle of the various modified PLGA films

	Nf	N2	N5
Contact Angle (n=4)	71.6 ± 2.8	63.2 ± 1.4	52.2 ± 2.2
	Pf	P2	P5
	32.4 ± 4.3	-	-

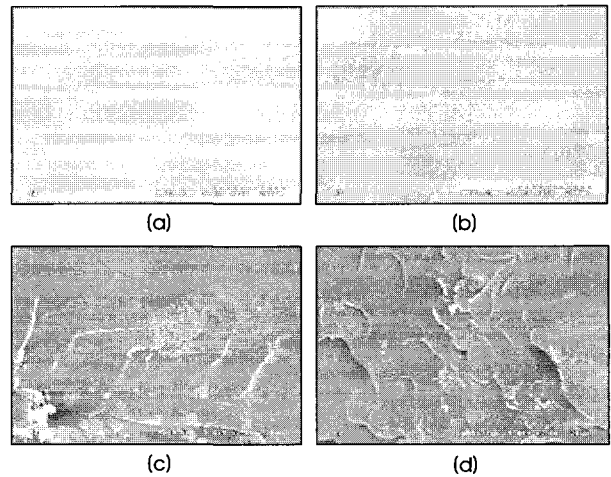


그림 2. 표면 개질된 PLGA 필름의 표면 분석 (a) PLGA 필름; (b) 플라즈마 처리된 PLGA 필름; (c) β-glucan 처리된 PLGA 필름; (d) 플라즈마/β-glucan 처리된 PLGA 필름.

Fig. 2. SEM photographs of modified PLGA films. (a) non-treated film (b) only plasma treated film (c) only β-glucans treated film (d) plasma/β-glucans treated film.

Fig 3은 표면 개질된 필름의 β-glucan의 방출량을 1, 3, 6일 측정하였다. 그 결과, coating 시 β-glucan의 농도에 비해 방출된 β-glucan의 농도가 낮은 것을 볼 수 있었으며 높은 β-glucan 농도 (5mg/ml)로 처리된 PLGA 필름에 많은 양의 β-glucan이 coating된 것을 확인하였다. 또한 플라즈마 처리 후 β-glucan을 coating한 시편이 더 많은 양의 β-glucan이 coating된 것을 확인하였다.

그 이유로는 플라즈마 처리를 한 후 표면의 친수성으로 인해서 β-glucan이 더 잘 코팅된 것으로 판단된다.

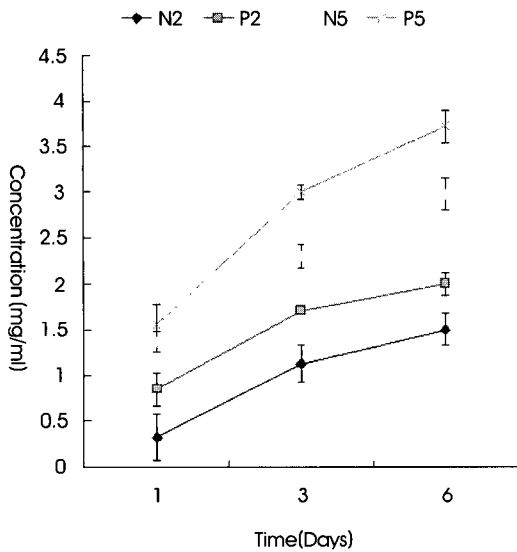


그림 3. 표면 개질된 PLGA 필름에서 방출된  $\beta$ -glucan의 농도 분석  
 Fig. 3. Analysis of released  $\beta$ -glucan concentration from modified PLGA film by phenol-sulfuric acid method.

**B. 표면 개질된 PLGA시편의 세포 성장 실험**

가. HDFs 증식에  $\beta$ -glucan이 미치는 영향

Fig 4에서 다양한 농도의  $\beta$ -glucan을 HDFs에 처리한 후 6일 배양한 결과, 2mg/ml의  $\beta$ -glucan 농도에서 세포 증식에 가장 많은 영향을 준 것을 확인하였다. 이 결과는  $\beta$ -glucan이 HDFs 증식에 직접적인 영향을 준 것으로 사료된다. 또한 Son등은 5mg/ml의  $\beta$ -glucan 농도에서 섬유아세포의 증식이 증가한다고 보고하였다 [15]. 이 결과에 의해 PLGA 표면 개질에 2mg/ml과 5mg/ml의  $\beta$ -glucan 농도를 사용하였다.

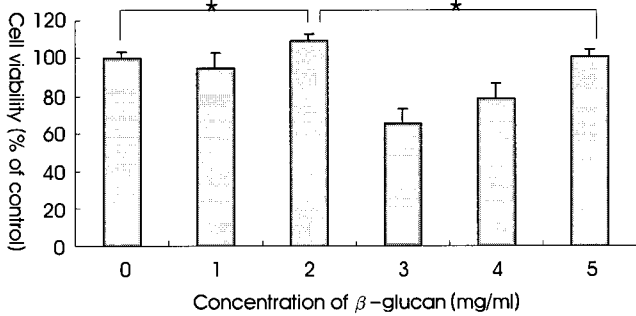


그림 4. 다양한  $\beta$ -glucan농도에서의 6일간 배양된 인간 섬유아모세포 성장 효과 ( $1 \times 10^4$  cells/well) ( $n=5, *p < 0.05$ )  
 Fig. 4. Effect of various  $\beta$ -glucan concentrations on proliferation of HDFs 6-day culture ( $1 \times 10^4$  cells/well) ( $n=5, *p < 0.05$ ).

나. 표면 개질된 PLGA 필름의 세포 부착 및 증식

세포의 초기 부착을 알아보기 위하여 HDFs를 seeding 후 4시간 뒤, MTT assay를 실시한 결과, control그룹 보다 플라즈마 처리를 한 그룹(P)이 약 1.4배의 초기 부착율이 높은 것을 알 수 있었다

(Fig 5). 또한  $\beta$ -glucan을 coating 한 그룹(N2)에서도 control 그룹보다 1.2배 높은 부착율을 보였다. 이 결과는 P그룹이 control그룹 보다 낮은 부착각으로 인해 친수화가 증가하여 세포 초기 부착에 영향을 준 것으로 판단된다(Table 2).

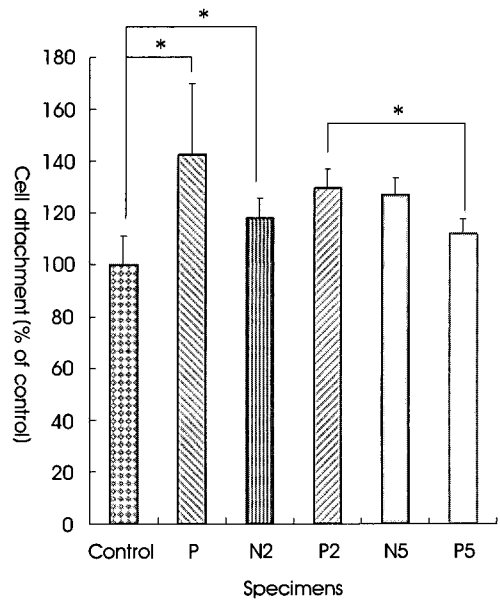


그림 5. 표면 개질된 PLGA 필름에서의 인간 섬유아모세포의 부착 ( $2 \times 10^4$  cells/film) ( $n=4, *p < 0.05$ )  
 Fig. 5. Attachment of HDFs ( $2 \times 10^4$  cells/film) on modified PLGA films ( $n=4, *p < 0.05$ ).

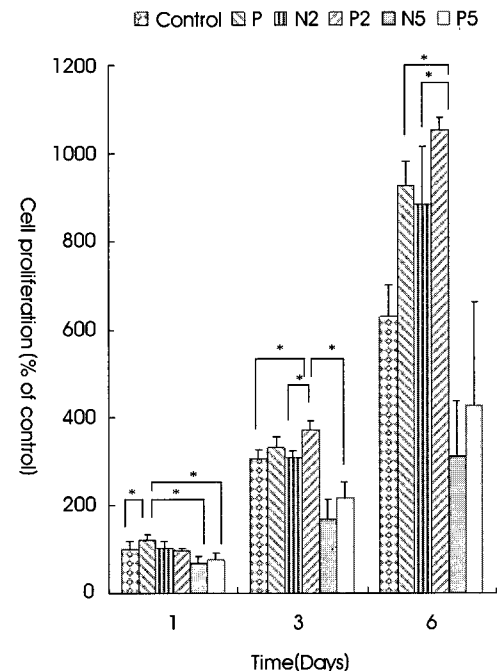


그림 6. 표면 개질된 PLGA 필름에서의 인간 섬유아모세포의 증식 ( $2 \times 10^4$  cells/film) ( $n=4, *p < 0.05$ )  
 Fig. 6. Proliferation of HDFs ( $2 \times 10^4$  cells/film) on modified PLGA films ( $n=4, *p < 0.05$ ).

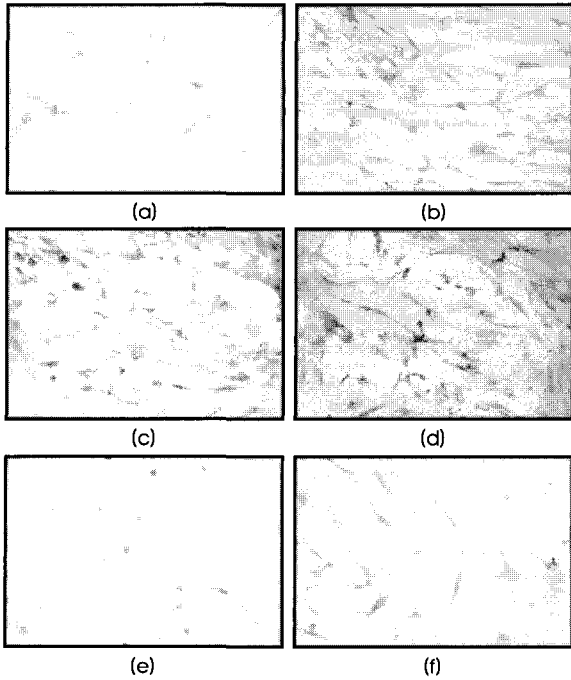


그림 7. 6일간 표면 개질된 PLGA 필름에 배양된 인간 섬유아세포의 형태 관찰. (a) PLGA 필름 (control); (b) 플라즈마 처리된 PLGA 필름 (P) (c) 2mg/ml β-glucan 처리된 PLGA 필름 (N2); (d) 플라즈마/ 2mg/ml β-glucan 처리된 PLGA 필름 (P2); (e) 5mg/ml β-glucan 처리된 PLGA 필름 (N5); (f) 플라즈마/ 5mg/ml β-glucan 처리된 PLGA 필름 (P5).

Fig. 7. Inverted microscope (x400) of HDFs cultured on various specimens for 6 days. (a) non-treated PLGA (control); (b) plasma treated PLGA (P) (c) 2mg/ml β-glucan treated PLGA (N2); (d) plasma/ 2mg/ml β-glucan treated PLGA (P2); (e) 5mg/ml β-glucan treated PLGA (N5); (f) plasma/ 5mg/ml β-glucan treated PLGA (P5)

Fig 6은 표면 개질된 필름에 HDFs를 seeding 하여 6일간 배양 한 후 세포 증식도를 나타내었다. 1일째는 세포 초기 부착율이 높은 P그룹에서 높은 세포 증식 결과를 보였다. 6일째 세포 배양 결과를 보면 5mg/ml β-glucan을 coating한 그룹(N5, P5)의 세포 성장이 2mg/ml β-glucan을 coating한 그룹(N2, P2) 보다 낮은 것을 확인하였다. 이것은 β-glucan의 방출량을 측정 한 결과를 보면 5mg/ml β-glucan을 coating한 그룹(N5, P5)의 농도가 6일째 3mg/ml 이상이 되는 것을 볼 수 있는데 β-glucan의 농도가 3mg/ml 이상이 되었을 경우 배양배지의 점도로 인해 세포의 성장에 방해가 되는 것으로 판단된다. 이 결과로서 적정의 β-glucan이 세포 성장에는 효과적이나 배양배지의 점도를 높이는 3mg/ml 이상의 농도는 세포 성장에 효과적이지 못한 것을 알 수 있었다. 6일째 배양 결과 P2 그룹에서 다른 그룹에 비하여 높은 세포 증식 결과를 보였다. 그 이유로는 다른 그룹(N2, N5, P5)에 비하여 6일째 β-glucan 최종 방출량이 β-glucan이 HDFs 증식에 가장 많은 영향을 주는 2mg/ml에 가까운 농도를 유지하기 때문인 것으로 판단된다(Fig3).

P그룹과 N2그룹은 P2 그룹에 비해 세포 증식률은 낮았으나 두

군 간에는 세포 증식률의 차이는 보이지 않았으며 control 그룹에 비하여 높은 증식률을 보였다. 이 결과로 세포의 초기 부착률이 높을수록(P그룹) 증식이 잘되는 것을 알 수 있었으며, 필름에서의 β-glucan의 방출이 HDFs의 증식에 영향을 준 것을 알 수 있었다.

#### 다. PLGA 필름의 세포 morphology 분석

Fig 7, 8은 6일째 세포 배양된 표면 개질된 PLGA 필름을 H&E 염색과 SEM으로 관찰한 것이다. 그 결과 P, N2 그리고 P2 그룹이 다른 그룹에 비하여 세포 형태가 잘 유지된 것을 확인할 수 있었다. (Fig. 7(b), (c), (d)). SEM 촬영 결과, P와 P2 그룹에서 많은 양의 세포를 관찰 할 수 있었다(Fig 8(d), (f)). 따라서 앞선 세포 증식에 의한 결과(Fig 6)와 마찬가지로 2mg/ml β-glucan을 coating한 그룹(N2, P2)과 플라즈마 처리한 그룹(P)에서 더 많은 세포 밀도를 확인할 수 있었다.

## IV. 결론

본 연구에서는 PLGA 표면에 친수성을 주기 위해 플라즈마 처리와 섬유아세포 활성을 높이기 위한 방법으로 β-glucan coating을 하여 HDFs를 배양하여 부착 및 증식을 높이려고 하였다. 그 결과, 세포의 초기 부착률은 친수성이 높은 플라즈마를 처리한 군에

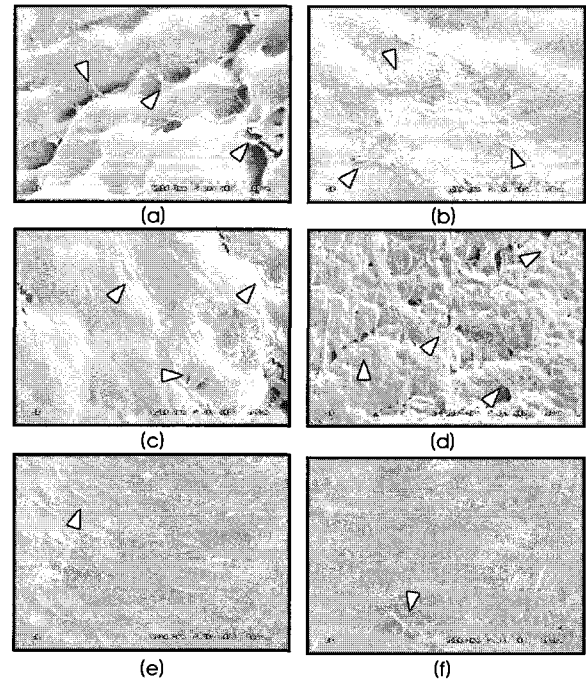


Fig. 8. SEM photographs (x400) of HDFs cultured on various specimens for 6 days. (a) non-treated PLGA (control); (b) plasma treated PLGA (P) (c) 2mg/ml β-glucan treated PLGA (N2); (d) plasma/ 2mg/ml β-glucan treated PLGA (P2); (e) 5mg/ml β-glucan treated PLGA (N5); (f) plasma/ 5mg/ml β-glucan treated PLGA (P5); Arrow indicate the HDFs on the PLGA film.

서 가장 높은 것을 알 수 있었으며 세포의 증식률은 최종 방출량이 2mg/ml의  $\beta$ -glucan 농도를 유지한 플라즈마 처리 후 2mg/ml  $\beta$ -glucan 을 코팅한 PLGA 필름에서 가장 높은 결과를 알 수 있었다. 또한  $\beta$ -glucan의 점도에 따른 세포 성장을 방해 할 수 있음을 확인하였다. Morphology 결과 세포 증식률과 같은 결과를 얻음으로서 그 결과를 뒷받침 하였다.

결론적으로, 플라즈마/  $\beta$ -glucan(2mg/ml) PLGA 필름은 세포 증식을 위한 충분한 조건을 갖추었으며 피부 조직 재생 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 참고 문헌

- [1] B.L. Seal, T.C. Otero, A. Panitch, "Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration," *Mater Sci. and Eng.*, vol. 34, pp.147-230, 2001.
- [2] Khang GS, Lee Sj, Jeon JH, Lee HB., "Interaction of fibroblast cell onto physicochemically treated PLGA surfaces," *Polymer (Korea)*, vol.24, pp.869-876, 2000.
- [3] Ting-Wu Q, Zhi-Ming Y, Ze-Zhi W, Hui-Qi Xie, Jian Q, Shao-Xi Cai, "Adhesion strength of human tenocytes to extracellular matrix component-modified poly (D,L-lactide-co-glycolide acid) substrates," *Biomater*, vol.26, pp.6635-6642, 2005.
- [4] Ming-Hua H, Da-Ming W, Hsyue-Jen H, Hwa-Chang L, Tzu-Yang H, Juin-Yih L, "Lein-Tuan H Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds," *Biomater*, vol.26, pp.3197-3206, 2005.
- [5] J.J. Yoon, S.H. Song, D.S. Lee, T.G. Park, "Immobilization of cell adhesive RGD peptide onto the surface of highly porous biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas foaming/salt leaching method," *Biomater*, vol. 25, pp.5613-5620, 2004.
- [6] M. Ramchandani, D. Robinson, "In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants," *J. Controlled Release*, vol.54, pp.167-175, 1998.
- [7] Gao J, Niklason L, Langer R, "Surface hydrolysis of Poly(glycolic acid) mechs increase the seeding density of vascular smooth muscle cells," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol.42, pp.417-424, 1999.
- [8] Chavan M, Suzuki T, Recowicz M, Lennarz W., "Genetic, biochemical, and morphological evidence for the involvement of N-glycosylation in biosynthesis of the cell wall beta 1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*," in *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2003, vol.100, pp.15381-15386.
- [9] Sang Bong Lee, Hyun Wook Jeon, Young Woo Lee, et al., "Bio-artificial skin composed of gelatin and (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucan," *Biomater*, vol.24, pp.2503-2511, 2003.
- [10] Delatte SJ, Evans J, Hebra A, Adamson W, "Othersen HB, Tagge EP. Effectiveness of beta-glucan collagen for treatment of partial-thickness burn in children," *J. Pediatr. Surg.*, vol.36, pp.113-118, 2001.
- [11] Kernodle DS, Gates H, Kaiser AB, "Prophylactic anti-infective activity of poly-[1-6]-beta-D-glucopyranosyl-[1-3]-beta-D-glucopyranose glucan in a guinea pig model of staphylococcal wound infection," *Antimicrob Agents Chemother*, vol.42, pp.545-549, 1998.
- [12] Kaiser AB, Kernodle DS., "Synergism between poly-(1-6)-beta-D-glucopyranosyl - [1-3]-beta-D-glucopyranose glucan and cefazolin in prophylaxis of staphylococcal wound infection," *Antimicrob Agents Chemother*, vol.42, pp.2449-2451, 1998.
- [13] A. Mueller, J. Raptis, P.J. Rice, J.H. Kalbfleisch, R.D. Stout, H.E. Ensley, W. Browder, D.L. Williams, "Modulation of Endotoxin- and Enterotoxin-Induced Cytokine Release by In Vivo Treatment with beta-(1,6)-Branched beta-(1,3)-Glucan," *Glycobiology*, vol.10, pp.339-346, 2000.
- [14] P. Kougias, D. Wei, P.J. Rice, H.E. Ensely, J. Kalbfleisch, D.L. Williams, I.W. Browder, " The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line," *Infect. Immun.*, vol.69, pp.3933, 2001.
- [15] Son HJ, Bae HC, Kim HJ, Lee DH, Han DW, Park JC., "Effect of beta-glucan on proliferation and migration of fibroblasts," *Current Appl. Phy.*, vol.5, pp.468-471, 2005.